

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. Februar 2001 (08.02.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/09287 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12N 5/00 (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHMITT, Manfred
[DE/DE]; Hohenaschauerstr. 10, D-81669 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/04949
- (22) Internationales Anmeldedatum: 30. Mai 2000 (30.05.2000) (74) Anwalt: BEHNISCH, Werner; Reinhard-Skühra-Weise
& Partner GbR, Postfach 44 01 51, D-80750 München
(DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AU, CA, JP, US.
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).
- (30) Angaben zur Priorität:
299 13 522.5 3. August 1999 (03.08.1999) DE
299 13 524.1 3. August 1999 (03.08.1999) DE
299 13 526.8 3. August 1999 (03.08.1999) DE
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: HÖHN, Gerrit [DE/DE]; Angerstr. 9,
D-85416 Niederhummel (DE). MEYER-PITTRÖFF,
Roland [DE/DE]; Ganzenmüllerstr. 29, D-85354 Freising
(DE). MITTELMEIER, Wolfram [DE/DE]; Angerweg
1, D-81735 München (DE).
- Veröffentlicht:
— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PRESSURE TREATMENT OF CELLS

WO 01/09287 A2 (54) Bezeichnung: DRUCKBEHANDLUNGSVERFAHREN VON ZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for modifying the replicative capacity and/or the protein structure of human or animal cells and/or human or animal tissue and/or microorganisms or prions that are present in or together with said cells and/or said tissue. According to the inventive method, the cells and/or the tissue and/or the microorganisms that are present in or together with said cells are subjected to pressures exceeding 100 MPa in a medium that is liquid at these pressures.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Veränderung der Replikationsfähigkeit und/oder der Proteinstruktur von menschlichen oder tierischen Zellen und/oder menschlichem oder tierischem Gewebe und/oder von in oder mit den Zellen und/oder dem Gewebe vorliegenden Mikroorganismen oder Prionen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen und/oder das Gewebe und/oder die in oder mit diesen Zellen vorliegenden Mikroorganismen Drücken von über 100 MPa in einem bei diesen Drücken flüssigen Medium ausgesetzt werden.

DRUCKBEHANDLUNGSVERFAHREN VON ZELLEN

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Veränderung der Replikationsfähigkeit und/oder der Proteinstruktur von menschlichen oder tierischen Zellen und/oder Geweben und/oder von in oder mit den Zellen vorliegenden Mikroorganismen oder Prionen, durch Hochdruckbehandlung.

Die Anwendung der Hochdrucktechnologie im Druckbereich von 100 Mega Pascal (MPa) bis 1000 MPa gewinnt in der Lebensmitteltechnologie seit einigen Jahren an zunehmender Bedeutung. Die industrielle Verwendung dieser Technologie zur Haltbarmachung von Lebensmitteln basiert auf der Möglichkeit eine Inaktivierung von Mikroorganismen zu erzielen, ohne dabei die Geschmacksqualität vieler behandelter Nahrungsstoffe wesentlich zu beeinträchtigen. Zwei grundlegende Prinzipien liegen der Hochdrucktechnologie zu Grunde:

Das Prinzip von *Le Chatelier* bildet die wichtigste Grundlage zum Verständnis druckinduzierter Einflüsse auf chemische Reaktionen. Dieses Prinzip besagt, daß unter Gleichgewichtsbedingungen Reaktionen, die mit einer Volumenabnahme gekoppelt sind, durch Druck gefördert werden. Temperatur und Druck beeinflussen die Kinetik chemischer Reaktionen. Die Ursache ist die Änderung des chemischen Potentials der beteiligten Substanzen. Für die Lage des Gleichgewichtes ist die Änderung des

Reaktionsvolumens $\overline{\Delta V}$ entscheidend. Unter Druck wird das Gleichgewicht der Reaktion in Richtung des kompakteren Zustandes verschoben. Die Auswirkung einer Druckerhöhung auf die Reaktionsgeschwindigkeit und damit auf die Geschwindigkeitskonstante k_x hängt mit der Änderung des Aktivierungsvolumens (ΔV^*) zusammen. Die Geschwindigkeitskonstante k_x nimmt zu, wenn das Aktivierungsvolumen einen negativen Wert annimmt und umgekehrt. Diese beiden Zusammenhänge werden in den Gleichungen (2.1) und (2.2) dargestellt.

$$-RT(d \ln K_x / dP)_T = \overline{\Delta V} \quad (2.1)$$

$$-RT(d \ln k_x / dP)_T = \Delta V^* \quad (2.2)$$

Das zweite grundlegende Prinzip ist das der Isostatik, welches besagt, daß Druck gleichmäßig und unverzüglich auf einen Körper und auf das Innere eines Körpers wirkt. Somit ist der Druckaufbau unabhängig von der Zeit.

Der Hydrostatische Druck wird mit Hilfe einer Pumpe in einem dafür geeigneten Stahlzylinder erzeugt. Die Aufrechterhaltung eines bestimmten Drucks für einen definierten Zeitraum erfordert keine zusätzliche Energie. Unter Druck verändern sich physikalische und chemische Eigenschaften von Wasser, wie z.B. Dichte, Ionendissoziation, pH-Wert und der Schmelzpunkt von Eis. Makromolekulare Konformationsänderungen, Strukturveränderungen von Zellmembranen und verändertes Kristallisierungsverhalten gehen mit einer Volumenabnahme einher und werden durch Druck beschleunigt. Durch Hochdruckbehandlung können zum einen verschiedene Enzyme inaktiviert werden (ATPasen von Mikroorganismen, Actomyosin- und Myosin ATPasen im Fischmuskel), andererseits kommen nahezu baroresistente Enzyme vor (Lipoxygenase, Peroxidase), die ihre Aktivität unter Druck kaum ändern. Forschungsaktivitäten sind bisher in der Lebensmitteltechnologie

gie im Bereich der Inaktivierung von Mikroorganismen durch Hochdruckbehandlung unternommen worden. Im Gegensatz dazu liegen bisher keinerlei Untersuchungen vor, die das Verhalten humaner Zellen unter Druckbehandlung beschreiben. Theoretisch ergeben sich unterschiedliche Ansätze für Untersuchungen an menschlichen Zellen und Geweben, wie z.B. Hochdruckbehandlung von Lungengewebe und Gefäßendothel im Bereich der Baromedizin, Hochdruckbehandlung von Knochen im Rahmen der Osteomyelitis, Hochdruckbehandlung von Tumorzellen im Bereich der onkologischen Forschung um nur einige Ansätze zu nennen.

In der Transplantationschirurgie ist es Stand der Technik, daß vor einer Transplantation die Gewebeverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger untersucht wird. Erst wenn diese Untersuchung zeigt, daß der MHC (Major histocompatibility complex) und das HLA (Human leucocyte locus) von Spender und Empfänger weitgehend übereinstimmen, wird eine Transplantation durchgeführt. Trotz dieser Untersuchungen ist es lediglich bei Autotransplantaten und Synotransplantaten möglich, eine Abwehrreaktion des Immunsystems gegen das Transplantat gänzlich auszuschließen. Aus diesem Grund werden Patienten bei Transplantationen immunsupprimierende Medikamente, wie beispielsweise Cyclosporin, verabreicht, die das Immunsystem soweit supprimieren, daß keine Abwehrreaktion mehr stattfindet.

Der Nachteil dieser Methode liegt darin, daß das Immunsystem des Transplantatempfängers durch die Supprimierung auch in seiner Funktionalität gegenüber pathogenen Mikroorganismen stark eingeschränkt ist. So kommt es bei Transplantationspatienten vielfach zu Infektionserkrankungen. Insbesondere in den ersten Tagen nach der Transplantation werden immunsupprimierende Medikamente in hohen Dosen verabreicht, da

es insbesondere in diesen ersten Tagen zu einer Abstoßung des Transplantates kommen kann. Durch diese Immunsystemsupprimierung kommt es häufig zu Infektionen, die in vielen Fällen zum Tode führen.

Ein weiterer Nachteil bei der Transplantation von Geweben ist nicht nur die mangelnde Gewebeverträglichkeit, sondern auch die mögliche Kontamination des Gewebes mit Krankheitserregern. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen oder Prionen.

Ein weiterer Nachteil bei der Transplantation von Geweben ist die mögliche Kontamination mit Tumorzellen. So wäre es wünschenswert, um Abstoßungsreaktionen weitgehend zu vermeiden, Tumorgewebe aus einem Patienten zu entnehmen, die Tumorzellen weitestgehend so zu eliminieren, daß ein weiteres Wachstum ausgeschlossen ist, und dieses Gewebe anschließend wieder in den Patienten einzubringen.

Alternativ zur Transplantation wird derzeit nach wie vor die Bestrahlung zur Tumorbehandlung eingesetzt. Dieses Verfahren hat den Nachteil, daß neben dem Tumorgewebe auch gesundes Gewebe in starkem Ausmaß zerstört wird. Überdies tritt bei diesem Verfahren eine starke Strahlenbelastung beim Patienten auf.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren weisen, wie oben beschrieben, gravierende Nachteile auf.

Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, welches diese Nachteile weitgehend vermeidet oder doch zumindest deutlich verringert, so daß die mit einer Transplantation verbundenen Gefahren entweder gänzlich

eliminiert oder zumindest in akzeptabler Weise vermindert werden.

Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren nach Anspruch 1 gelöst, wobei menschliche und/oder tierische Zellen und/oder menschliches oder tierisches Gewebe und und/oder die in oder mit diesen Zellen und/oder dem Gewebe vorliegenden Mikroorganismen oder Prionen Drücken von über 100 MPa ausgesetzt werden. Die Zellen sind dabei von einem Medium umgeben, welches bei diesen Drücken flüssig ist.

Weitere Ausgestaltungsformen der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Beschreibung, den Patentansprüchen sowie den Ausführungsbeispielen. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die nachfolgend genannten Beispiele und bevorzugten Ausgestaltungen beschränkt.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren können beispielsweise die Replikationsfähigkeit und die Proteinstruktur von Zellen verändert werden. Unter Replikationsfähigkeit wird erfindungsgemäß die Fähigkeit der Zellen verstanden, sich zu teilen. Durch die Druckbehandlung kann die Replikationsfähigkeit entweder vermindert oder völlig gestoppt werden, d.h. die Zellen können nach der Behandlung durch das hier beschriebene Verfahren z.B. auch abgetötet worden sein. Es ist aber auch möglich, durch gezielte Auswahl der Parameter des hier beschriebenen Verfahrens, also durch Steuerung sowohl der Höhe der Drücke, der Temperatur, der Einwirkungsdauer der Drücke, durch Auswahl der die Zellen umgebenden Medien, durch verschiedene pH-Werte sowie durch mehrfache Wiederholung der Druckeinwirkung das Verfahren so zu steuern, daß die nachfolgenden Wirkungen, entweder einzeln oder in Kombination, erzielbar sind:

- Verminderung der Replikationsfähigkeit von Zellen und/oder Mikroorganismen;
- Abtötung der Zellen und Mikroorganismen;
- Veränderung der Proteinstruktur von Zellen, beispielsweise der MHC-Moleküle oder HLA-Moleküle, um das immunogene Potential der Zellen zu beeinflussen;
- Selektive Abtötung von Tumorzellen;
- Änderung der Struktur von Prionen, so daß sie ihr pathogenes Potential verlieren;
- Veränderung von Zelleistungen wie zum Beispiel der Adhäsion oder der Enzymproduktion bzw. -ausschüttung, z.B. mit dem Ziel einer verminderten Ausschüttung von Proteasen;
- Veränderung von biologischen Eigenschaften der Interzellulärsubstanz (z.B. Kollagen);
- Veränderung des Zellverbundes zur Auflösung von Geweben;
- Veränderung der mechanischen Eigenschaften von Geweben;
- Veränderung der Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen.

Das Verfahren kann bei menschlichen und tierischen Zellen oder Geweben angewendet werden. Bei Gewebe handelt es sich in der Regel um Zellverbände gleichartig differenzierter Zellen. Unter diesen Begriff fallen aber auch solche Gewebe, die zu einem größeren Teil nicht aus Zellen bestehen und der größte Anteil aus Interzellulärsubstanz besteht. Derartige Gewebe sind beispielsweise Knochen, die neben Zellen zum größten Teil aus der organischen Knochenmatrix und Knochenmineral bestehen. Erfindungsgemäß sind auch derartige Gewebe umfaßt, die nur zu einem geringen Anteil aus Zellen bestehen, wie Knochen, Knorpel, Sehnen, Bänder oder Gefäße. Das Verfahren kann bei Zellen oder Geweben angewendet werden, die von Mikroorganismen

befallen sind oder die mit Mikroorganismen vergesellschaftet sind. Unter Mikroorganismen sind erfindungsgemäß beispielsweise Viren, Bakterien, Protozoen und Pilze zu verstehen, insbesondere natürlich solche Mikroorganismen, die ein pathogenes Potential besitzen. Weiterhin können mit Prionen befallene Zellen derart behandelt werden, daß eine selektive Zerstörung der Prionenstruktur bewirkt wird.

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren behandelten Zellen liegen im allgemeinen in Form von Zellverbänden, bevorzugt also Gewebeverbänden, vor. Als Gewebeverbände werden beispielsweise Organe bezeichnet, wie Niere, Herz, Leber, Milz, aber auch Darm, Magen sowie Knochen, Sehnen, Bänder oder Gefäße. Erfindungsgemäß bevorzugt behandelbar sind beispielsweise Knochen, Sehnen und Gefäße.

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren behandelten Organe sind beispielsweise autogene Organpräparate, die einem Patienten, dessen Organ beispielsweise von Tumorzellen befallen ist, entnommen werden und nach der erfindungsgemäßen Behandlung wieder reimplantiert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren kann entweder "schonend" angewendet werden, d.h. die Tumorzellen werden möglichst selektiv, ohne die gesunden Zellen zu beeinflussen, in ihrer Replikationsfähigkeit herabgesetzt oder abgetötet, und das derart behandelte Gewebe wird dem Patienten wieder implantiert. Die in ihrer Replikationsfähigkeit supprimierten malignen Zellen sterben nach ihrem Lebenszyklus ab, ohne sich weiter zu vermehren und können vom Organismus abgebaut werden. Wahlweise können die bei der Druckbehandlung abgetöteten oder in ihrer Replikationsfähigkeit herabgesetzten Zellen vor der Reimplantierung in den Patienten von dem restlichen Gewebe entfernt werden.

Es ist aber auch möglich, die entnommenen Gewebeteile wie Knochen, Sehnen und Gefäße einer solchen Druckbehandlung zu unterziehen, daß praktisch alle vorhandenen lebenden Zellen abgetötet werden. Das verbleibende, nicht mehr lebensfähige Gewebe wird dann in den Patienten implantiert und dient als Leitstruktur für den Aufbau neuer Knochensubstanz, neuer Sehnen und neuer Gefäße. Auch im Fall der Transplantation von Knochen, Sehnen oder Gefäßen, wobei praktisch alle lebenden Zellen abgetötet werden, ist erfindungsgemäß vorgesehen, daß nach der erfindungsgemäßen Druckbehandlung abgetötete Zellen vor der Implantation zumindest teilweise entfernt werden, falls erforderlich. Besonders bewährt hat sich die Verwendung von übertragenem Knochen als Leitsubstanz (sog. osteokonduktiver oder osteoinduktiver Effekt).

Die Übertragung des Knochens als Leitsubstanz ist bereits seit langem bekannt. Übertragener (allogener) Knochen wird „schleichend“ umgebaut und der übertragene Knochen dient somit als Leitstruktur. Weitere Untersuchungen konnten die zugrunde liegenden Mechanismen aufklären. Allogene Knochensegmente haben jedoch aufgrund der Antigen-Eigenschaften und resultierender Abwehrreaktionen den Nachteil, nur erheblich verzögert einzuwachsen im Vergleich zu körpereigenen, d.h. autogenen Transplantaten.

Anhand von keramisierten Knochensegmenten konnte nachgewiesen werden, daß die Mineralsubstanz des Knochens als Leitschiene für die Knochenneubildung dient (Mittelmeier, W., 1992, Demeter Verlag, Monographie Knochenneubildung im ersatzschwachen Lager).

Um den allogenen Knochen in optimierter Form (weniger Abwehrreaktion) und unter Minderung des Infektions- und Tumorrisikos übertragen zu können, wurden zahlreiche Versuche unternommen, den Knochen physikalisch und chemisch aufzubereiten (Übersicht der betreffenden Literatur in der Monographie von Mittelmeier, W., 1992, Demeter Verlag, Monographie Knochenneubildung im ersatzschwachen Lager).

Um den Knochen nach Tumorbefall von dem betreffenden Übertragungsrisiko des Tumors befreien zu können (durch Abtötung aller Zellen), wurden bereits ionisierende Strahlen versucht.

Das erfindungsgemäß vorgestellte Verfahren soll bevorzugt - bezüglich der Knochenübertragung - zur Minderung allergener Eigenschaften, Reduktion von Infektionsrisiken und zur Abtötung von Tumorzellen eingesetzt werden. Dabei spielt die Erhaltung der Grundsubstanz des Knochens als Leitstruktur eine wesentliche Rolle.

Das Verfahren hat den Vorteil, daß vorhandene Krankheitserreger oder Tumorzellen abgetötet und körpereigenes Gewebe reimplantiert wird, welches als Grundlage für das neue Wachstum, beispielsweise des Knochens, dienen kann.

Das Verfahren kann jedoch auch dazu benutzt werden, Organe von fremden Spendern zu behandeln, um insbesondere diejenigen Proteinstrukturen auf den Zellen zu verändern, die für eine Abstoßungsreaktion verantwortlich sind. Hierbei handelt es sich insbesondere um MHC- und HLA- Proteine. Es ist neben allogenen Geweben aber auch möglich, xenogene Organe (beispielsweise aus Schweinen oder Rindern) zu behandeln, die an einen menschlichen Empfänger transplantiert werden sollen.

Die Behandlung dient hier ebenfalls dazu, die natürliche Abstoßungsreaktion des Körpers zu vermindern und hierdurch die Verabreichung immunsupprimierender Medikamente auf ein Mindestmaß zu reduzieren oder zu vermeiden.

Das Verfahren wird im allgemeinen so durchgeführt, daß die zu behandelnden Zellen, die, wie bereits oben ausgeführt, bevorzugt in Gewebeverbänden wie Organen vorliegen, bevorzugt in ein physiologisches Medium gegeben und von einer Hülle umgeben werden. Unter physiologischen Medien sind solche an sich bekannten Medien zu verstehen, die üblicherweise zur Aufbewahrung von Organen oder zur Kultivierung von Zellen in der Zellkultur eingesetzt werden. Hier handelt es sich beispielsweise um physiologische Kochsalzlösung, supplementiert beispielsweise mit Nährstoffen, Antibiotika, Zytostatika, Hormonen, Lyphomkinen usw. Die Zusammensetzung des umgebenden Mediums hängt natürlich von den zu behandelnden Zellen ab und ist dem Fachmann bekannt oder kann durch Versuche ermittelt werden. Das Gewebe, beispielsweise der Knochen, kann aber auch direkt ohne ein derartiges Medium von einer Hülle umgeben sein, die flüssigkeitsdicht sein und ein Eindringen von Flüssigkeit von außen verhindern soll. Hierbei handelt es sich beispielsweise um eine Kunststoffhülle. Die Hülle selbst ist von einem Medium umgeben, was zu einer gleichmäßigen Verteilung der hohen Drücke von über 100 MPa führt. Ohne das umgebende Medium würden die Zellen zwangsläufig völlig zerstört werden. Nur durch die sie umgebende Flüssigkeit wird eine gleichmäßige Verteilung der Drücke sichergestellt. Bei der Flüssigkeit handelt es sich bevorzugt um viskose Mittel, beispielsweise Glykol, in Verbindung mit Wasser oder ein Gemisch aus Ether und Kerosin. Weitere Flüssigkeiten können vom Fachmann eingesetzt werden.

Anstatt flüssiger Medien können auch gasförmige Medien eingesetzt werden, die durch die angewendeten hohen Drücke in einen flüssigen Zustand übergehen. Beispiele hierfür sind Propan, Butan oder Kohlendioxid.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das zu behandelnde Zellmaterial nicht nur von einer, sondern von mehreren, zumindest zwei Hüllen umgeben, um eine Kontamination des Gewebes soweit wie möglich zu verhindern.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Drücke liegen bei über 100 MPa. Bevorzugt liegen sie in einem Bereich von 100 - 1000 MPa, wobei Drücke im Bereich von 100 - 500, bis 400, bis 300, bis 250 MPa bevorzugt sind. Insbesondere bevorzugt werden Drücke im Bereich von 100 - 300 MPa eingesetzt; in diesem Bereich werden je nach Art der zu behandelnden Zellen und nach Art der zu erzielenden Wirkung die Drücke durch Vorversuche vom Fachmann eingestellt.

In Vorversuchen hat sich beispielsweise herausgestellt, daß eine deutliche Hemmung der Replikationsfähigkeit der Zellen ab ungefähr 150 MPa einsetzt, wobei eine erhebliche Reduktion der Replikationsfähigkeit und damit der Überlebensfähigkeit der Zellen ab 175 MPa erzielbar ist und, beispielsweise bei Fibroblastenzellen in der Zellkultur, ab 225 MPa keine überlebenden Zellen mehr nachweisbar sind. Der Fachmann wird, um die optimalen Drücke zu ermitteln, die geeignet sind, eine bestimmte Wirkung zu erzielen, Vorversuche an gleichen oder vergleichbaren Zellen, Geweben und/oder Organen vornehmen. Die Ergebnisse der Druckbehandlung werden durch geeignete Kontrollexperimente, beispielsweise durch Messung der Enzymexpression, der Replikationsfähigkeit, der Abstoßungsrate, des Wachstums von Tumorzellen und durch die

Vielzahl der zur Verfügung stehenden biochemischen, einer Analysetechnik zugänglichen Parameter, überprüft.

Die erfindungsgemäße Druckbehandlung setzt sich aus drei Phasen zusammen, nämlich einer Druckaufbauphase, einer Druckhaltezeitphase und einer Druckabbauphase. Die Länge der einzelnen Phasen und die Geschwindigkeiten, mit der der Aufbau und der Abbau des Druckes erfolgt, werden ebenfalls vom Fachmann in Abhängigkeit von der zu erzielenden Wirkung bestimmt. So hat sich beispielsweise herausgestellt, daß der Druckaufbau mit 100 MPa pro Minute, gefolgt von einer Haltezeit von 5 - 10 Minuten und einer Druckabbauphase von 100 MPa pro Minute erfolgen kann. Nach einer Wartezeit von 5 - 10 Minuten wird bevorzugt die Druckbehandlung wiederholt, wobei die Wiederholung zwei bis zehn mal oder öfter erfolgen kann, bis die erzielte Wirkung erreicht wird. Durch eine derartige wiederholte Druckbehandlung kann erfindungsgemäß eine vergleichbare Wirkung erzielt werden, wie bei einer einfachen Druckbehandlung, wobei jedoch die eingesetzten Drücke deutlich darunter liegen. Beispielsweise beträgt der Druck bei einer einfachen Druckbehandlung zur Hemmung der Replikationsfähigkeit von Zellen und/oder Mikroorganismen bevorzugt ab 200 MPa, bevorzugter ab 225 MPa, wohingegen bei mehrfacher Druckbehandlung diese Wirkung bei Drücken unter 200 MPa, bevorzugt 150 MPa, erreicht werden kann. Durch die mehrmalige Wiederholung der Druckbehandlung unter schonenderen Druckbedingungen wird überdies eine Schädigung des umgebenden Gewebes weitgehend verhindert.

Ebenso ist erfindungsgemäß eine variable Druckbehandlung vorgesehen, wobei aufgrund der variablen Gestaltung des Druckprogramms eine Anpassung an die zu behandelnde Probe sowie eine Erniedrigung des Drucks im Vergleich zu einer

einfachen Druckbehandlung erfolgen kann. Auch bei einer variablen Druckgestaltung kann bspw. eine Hemmung der Replikationsfähigkeit bevorzugt schon bei Drücken unter 200 MPa, bevorzugter 150 MPa, erreicht werden.

Die Dauer der Druckbehandlung ist wiederum stark von den zu behandelnden Zellen und von der Art der zu erzielenden Wirkung abhängig. Die Druckbehandlung kann beispielsweise bis zu drei Stunden lang erfolgen, wobei alle Zeiten von 1 Sekunde bis zu 3 Stunden oder auch mehr denkbar sind. Bevorzugt hat sich ein Zeitraum von 5 Sekunden bis 60 Minuten herausgestellt, wobei eine Druckbehandlung von 5 Sekunden bis 60 Sekunden, bevorzugt 5 - 30 Sekunden oder 5 - 10 Sekunden bei hohen Drücken von ab 200 MPa bevorzugt wird. Die Länge der Druckbehandlung und die Höhe der Druckbehandlung stehen im allgemeinen im umgekehrten Verhältnis zueinander, d.h. je höher der Druck, desto kürzer die Zeitdauer der Behandlung und je niedriger der Druck, desto länger die Zeitdauer der Behandlung bzw. je geringer der Druck und je kürzer die Zeitdauer der Druckbehandlung, desto häufiger ist das Verfahren zu wiederholen.

Die Temperatur während der Behandlung kann von -45°C bei tiefgefrorenen Zellverbänden bis $+150^{\circ}\text{C}$ liegen, wobei natürlich bevorzugt die physiologischen Temperaturen von ca. $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ einsetzbar sind. Temperaturen bis 150°C können selbstverständlich nur kurzzeitig auf die Zellen einwirken, wenn nicht erwünscht ist, daß deren vollständige Zerstörung erfolgt. Auch die bevorzugte Temperaturhöhe kann vom Fachmann durch Versuche festgestellt werden.

Besonders bevorzugt kann das erfindungsgemäße Verfahren zur Behandlung von Knochen, Sehnen und Gefäßen eingesetzt werden.

Beispielsweise können mit Tumorzellen kontaminierte Knochen druckbehandelt werden. Da Tumorzellen sich wesentlich häufiger teilen als die normalen Zellen, die Druckbehandlung auf Zellen in der Zellteilungsphase besonders effizient wirkt, können selektiv Tumorzellen abgetötet werden, während die Normalzellen in ihrer Replikationsfähigkeit nicht oder nicht so gravierend gestört werden, daß ihr Überleben gefährdet wäre. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden Gewebe wie Knochengewebe und Sehnen und Gefäße so behandelt, daß sämtliche Zellen, also auch die gesunden Zellen, zerstört werden. Derart behandeltes Material wird dann in den Patienten wieder eingesetzt und dient als Leitstruktur zum Aufbau neuen gesunden Gewebes. Derart behandelte Knochen oder Knochenteile können als Knochenersatzmaterial zum Einsatz kommen. Wahlweise wird vor der Behandlung und/oder der Implantation ein Teil der Zellen oder des Gewebes von dem behandelten oder zu behandelnden Gewebe entfernt.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Die Erfindung ist jedoch nicht hierauf beschränkt.

Es wird auf die folgenden Figuren Bezug genommen:

FIGUR 1: Hydrostatische Druckbehandlung von U-2 OS Zellen von 125 MPa bis 300 MPa. Jedem Druckbereich ist eine Kontrollgruppe zugeordnet, die im Zeitraum der Druckbehandlung normalen Kulturbedingungen ausgesetzt war.

Figur 2: Darstellung der Zellzahl nach 48h Kultivierung von Saos-2- und NIH-3T3 Zellen nach HDB von 150 MPa bis

200 MPa. Steigender HD verursacht eine Reduktion der Viabilität aller Zelllinien.

Figur 3: Durch Trypanblau-Färbung (TF) ermittelter Viabilitätsverlust von Saos-2 Zellen und NIH-3T3 Zellen nach 48h Kultivierung. HD's von 175 MPa zeigen in der TF keine Reduktion der Viabilität; HD's ab 200 MPa führen zum vollständigen Viabilitätsverlust beider Zelllinien.

Figur 4: Darstellung der Zellzahl nach 72h Kultivierung von Saos-2 Zellen und NIH-3T3 Zellen nach HDB von 150 MPa bis 200 MPa. Messung der adhärenenten Zellen/ml Kulturmedium; Nach 72h Kultivierung erfolgt weiteres Zellwachstum nach 150 MPa HDB; eine HDB von 175 MPa reduziert die Anzahl adhärenenten Zellen beider Zellreihen, Ab einer HDB von 200 MPa kann keine Adhärenz von Zellen mehr festgestellt werden.

Figur 5: Darstellung des Viabilitätsverlusts von Saos-2- und NIH-3T3-Zellen nach 72h Kultivierung. Steigende hydrostatische Drücke verursachen vermehrten Viabilitätsverlust der Zelllinien; ab einem HD von 200 MPa konnte bei keiner der Kulturen ein Überleben von Saos-2- oder NIH-3T3 Zellen nachgewiesen werden.

BEISPIELE

Zur Beurteilung, welchen hydrostatischen Drücken murine und humane Zellen standhalten können, wurden drei unterschiedliche immortalisierte Zellreihen gewählt. Da bisher keine Anhaltspunkte für das Verhalten muriner und humaner Zellen vorliegen, wurde primär versucht, Druckbereiche zu ermitteln,

denen die o.g. Zelllinien standhalten können. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Zellen unterschiedlich auf den applizierten Druck reagieren.

Material und Methode

Die Applikation des hydrostatischen Drucks (HD) erfolgte mit einem Druckapplikator der Firma Dunze Hochdrucktechnik (Hamburg, FRG). Der Innendurchmesser der Druckkammer beträgt 20 mm bei beliebiger Einstellung der Höhe des Druckzylinders. Die Druckaufbau- und Abbauraten können mit diesem Gerät variiert werden. Bei den Versuchen wurde eine Druckaufbaurrate von 100 MPa/Minute gewählt. Der bei jedem Versuch festgelegte maximale hydrostatische Druck wurde bei allen Versuchen für 5 Minuten (Druckplateau) aufrechterhalten. Das Temperaturintervall lag zwischen 31° C und 37°C. Die Druckkammer war mit Wasser und 20% Glykol gefüllt.

Zelllinien und Zellkulturmedien

Hydrostatische Drücke wurden an drei unterschiedlichen Zelllinien getestet. Dabei handelte es sich um:

1. NIH 3T3 Zellen, immortalisierte Fibroblasten vom Mäuse Embryo der „NIH Swiss mouse“, wobei für die Versuche Zellen der 126 ten Passage verwendet wurden. Die Kultur der Zellen erfolgte in Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum ohne Antibiotikazusatz.

2. U-2 OS Zellen sind Osteosarkomzellen humanen Ursprungs, hypodiploid mit epithelähnlicher Morphologie. Sie entstammen einer 15 jährigen kaukasischen Patientin, deren Osteosarkomzel-

len 1964 isoliert wurden. Die Kultur der Zellen erfolgte in Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum ohne Antibiotikazusatz.

3. Saos-2 Zellen sind primäre, humane Osteosarkomzellen. Die Zelllinie stammt von einer 11 jährigen kaukasischen Patientin. Die epithelähnlichen Zellen sind hyperdiploid bis hypopentaploid. Die Kultur der Zellen erfolgte in Dulbeccos modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum ohne Antibiotikazusatz.

Hydrostatische Druckbehandlung (HDB)

Die Druckversuche erfolgten mit 7 Druckstufen, beginnend bei 150 MPa, in 25 MPa Schritten steigend bis 300 MPa. Bei jeder der Druckstufen wurden 3 Proben der jeweiligen Zelllinie dem entsprechenden hydrostatischen Druck ausgesetzt. Das Zellsplitting erfolgte 2 Tage vor dem jeweiligen Druckversuch. Die Zellzahl der Proben für die Druckexperimente betrug vor der Druckbehandlung bei allen Versuchen 30000 Zellen/ml in einem 2ml Eppendorfgefäß, welches für die Versuche in die Druckkammer gegeben wurde. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte vor dem Versuch. Nach der Druckbehandlung erfolgte die Verteilung der Zellen in 24 Loch Kulturschalen (Falcon, Becton Dickinson). In einem ersten Versuch wurde die Viabilität der Zelllinie U2OS nach Druckbehandlung und 72h Kultur bestimmt um den Druckbereich zu ermitteln, dem die Zellen standhalten können, bzw. den Druckbereich zu ermitteln, bei dem ein Überleben der Zellen nicht mehr gewährleistet ist. In einem zweiten Versuch wurde die Zellzahl sowie die Zellviabilität durch Trypanblaufärbung bei Saos-2 - und bei NIH 3T3 Zellen nach 48h und 72h

bestimmt. Bei jedem Versuch wurde eine Kontrollprobe (Zellen ohne Druckbehandlung) mitgeführt. Die Beurteilung der Kontrollproben erfolgte entsprechend den Beurteilungskriterien druckbehandelter Zellen. Jede Probe die in den Druckbehälter gegeben wurde enthielt die o.g. Zellzahl und DMEM Zellkulturmedium. Nicht in die Untersuchungen eingeschlossen waren Auswirkungen der Druckaufbau- und Abbauraten.

In der ersten Versuchsreihe wurden U-2 OS Zellen mit hydrostatischem Druck, ausgehend von 125 Megapascal (MPa) in 25 MPa Stufen steigend bis 300 MPa, behandelt. Nach hydrostatischer Druckbehandlung von 125 MPa wurde nach 72h Kultur eine Vermehrung von U-2 OS Zellen festgestellt. Die Zellzahl hatte sich von initial 30000 Zellen vor der HDB auf 83000 Zellen/ml nach 72h Kultur vergrößert. Nach Steigerung der Druckbelastung auf 150 MPa war weiterhin ein Zellwachstum möglich, jedoch wurde eine im Vergleich zur 125 MPa HD reduzierte Zellmenge von 73000 Zellen/ml beobachtet. Die HDB mit 175 MPa verursachte eine weitere Reduktion der Zellzahl nach 72h Kultur auf 35000 Zellen/ml. Die Steigerung des HD auf 200 MPa verursachte eine 100%ige Viabilitätsreduktion der Zellen. Bei einer Kontrollprobe, die keiner Druckbehandlung ausgesetzt war, wurde nach 72h Kultur eine Zellzahl von über 250 000 Zellen/ml beobachtet. Die Versuchungsergebnisse sind in Figur 1 dargestellt.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden humane Saos-2 Osteosarkomzellen und murine NIH-3T3 Mäusefibroblasten hydrostatischen Drücken, beginnend bei 150 MPa mit Steigerung der Druckstufen um 25 MPa bis 300 MPa ausgesetzt. Nach 72h Kultur konnte bei den mit einer HDB von 200 MPa behandelten Zellen kein Überleben beobachtet werden, weshalb die graphische Darstellung der 72h-Werte (siehe Figur 4) nur HD von maximal 200 MPa mit einbezieht.

Beeinflussung der Zellviabilität

Nach HDB von 150 MPa wurde nach 48h Kultur bei beiden Zelllinien kein Zelluntergang beobachtet. Die Zellzahl betrug bei beiden Zelllinien 30000/ml. Wurde der HD auf 175 MPa gesteigert, zeigte sich nach 48h Kultur eine Reduktion der Zellzahl bei Saos-2 Zellen auf 24000/ml und bei NIH-3T3 Zellen auf 20000/ml. Eine HDB von 200 MPa führt zu einer Viabilitätsreduktion bei Saos-2- und NIH-3T3 Zellen auf 3300/ml. Eine HDB von 225 MPa verursachte den vollständigen Viabilitätsverlust beider Zellreihen. Wie anhand der Figur 2 erkennbar, lagen die Zellzahlen bei den Kontrollproben, die keiner Druckbehandlung unterzogen wurden, bei 46 000 Zellen/ml (Saos-2) bzw. 57 000 Zellen/ml (NIH-3T3).

Der in Figur 3 dargestellte mittels Trypanblaufärbung ermittelte Viabilitätsverlust von humanen Saos-2 Zellen und murinen NIH-3T3 Zellen zeigte erst ab einer HDB von 200 MPa eine Reduktion der Zellviabilität bei Saos-2 Zellen von 33% des Ausgangswertes vor Druckbehandlung und bei NIH-3T3 Zellen eine Reduktion von 66% der Gesamtzellzahl. Bei niedrigeren Drücken von 175 MPa wurde keine Reduktion der Viabilität mittels Trypanblau Färbung festgestellt, die HDB von 225 MPa verursachte einen vollständigen Verlust der Zellviabilität beider Zelllinien.

Nach Kultivierung der Zellen für 72h konnten beide Zelllinien nach HDB mit 150 MPa Wachstum in Kultur zeigen (siehe Figur 4). Bei beiden Zelllinien wurde eine Zellzahl von 60000/ml gezählt, verursacht durch weiteres Zellwachstum nach Druckbehandlung. Eine Steigerung der HDB auf 175 MPa führte zu einer

Verminderung des Zellwachstums bei Saos-2- und NIH-3T3 Zellen auf 10000/ml innerhalb von 72h Kultivierung. Nach Behandlung der Zellen mit einem HD von 200 MPa konnte ein vollständiger Adhärenzverlust aller kultivierter Zellen erreicht werden. Die Kontrollprobe wies nach 72h Kultivierung eine Zellzahl von 100 000 Zellen/ml auf.

Durch Trypanblaufärbung der Zellen wurde nach 72h Kultivierung der Viabilitätsverlust der Zelllinien ermittelt. Die Ergebnisse sind in Figur 5 dargestellt. Nach HDB mit 150 MPa zeigten Saos-2- und NIH 3T3 Zellen 17% Viabilitätsverlust, nach Steigerung der HDB auf 175 MPa zeigten Saos-2 Zellen 67% Reduktion ihrer Viabilität und NIH 3T3 Zellen zeigten 88% Viabilitätsverlust. Ab einer HDB von 200 MPa wurde in allen Zellkulturen ein 100%tiger Viabilitätsverlust verursacht. Die HDB mit 225 MPa, 250 MPa und 300 MPa werden graphisch nicht dargestellt, da es hier zur vollständigen Schädigung der Zellen kam. Die Kontrollproben wiesen jeweils erwartungsgemäß keinen Viabilitätsverlust auf.

DISKUSSION:

Um die Möglichkeit einer medizinischen Anwendung der hydrostatischen Hochdrucktherapie zu untersuchen, wurden in vitro Druckversuche durchgeführt, indem die immortalisierten humanen Osteosarkomzelllinien U-2 OS- und Saos-2- sowie immortalisierte Mäusefibroblasten NIH 3T3 hydrostatischen Drücken zwischen 125 MPa und 300 MPa ausgesetzt wurden. In einem ersten Versuch wurden U-2 OS Zellen in 25 MPa Schritten hydrostatischen Drücken von 125 MPa bis 300 MPa ausgesetzt. Hierbei zeigte sich, daß nach 72h Kultivierung ein Überleben der verschiedenen Zelllinien nach HDB von 150 MPa möglich war und Drücke von 250

MPa ein Überleben der Zellreihen in Kultur unmöglich machten. Der so ermittelte Druckbereich wurde für die weiteren Versuche mit Saos-2- und NIH 3T3-Zellen verwendet. Insgesamt reagierten alle Zellreihen bei Steigerung des HD mit einer Viabilitätsreduktion, wobei unabhängig vom applizierten Druck eine unterschiedliche, zellspezifische Toleranz gegen HDB vorzuliegen scheint. NIH 3T3 Zellen zeigen nach 72h Kultivierung höhere Viabilitätsverluste, gemessen mit Trypanblaufärbung der Zellen, als Saos-2 Zellen, wobei das Adhäsionsverhalten nach HDB mit 150 MPa und 175 MPa beider Zelllinien keine wesentlichen Unterschiede aufweist. Die Zahl lebender, adhärenter Saos-2 Zellen nach 48h Kultur und 175 MPa HDB reduziert sich bis zu 72h, so daß eine nach 48h Kultur und 175 MPa HDB vorliegende subletale Schädigung der Zellen bei Saos-2 Zellen postuliert werden muß, die weder durch Trypanblaufärbung der Zellen noch durch die Bestimmung des Adhäsionsverhaltens nach 48h Kultur nachgewiesen werden konnte. Gleiches konnte bei NIH 3T3 Zellen im HD Bereich von 175 MPa beobachtet werden. Innerhalb des 150 MPa HD Bereiches zeigten Saos-2 und NIH 3T3 Zellen eine nach 72h vermehrte Anfärbung mit Trypanblau, so daß auch in diesem Druckbereich von Zellschäden ausgegangen werden muß, die durch Beurteilung von Adhäsion und Trypanblaufärbung nach 48h nicht bestimmt werden können.

Schädigung der Zellen in niedrigen Druckbereichen von 150 MPa, bei denen keine Zellschädigung mittels Trypanblaufärbung gezeigt werden konnte, scheinen sich zumindest auf das Adhäsionsverhalten von Saos-2 und NIH 3T3 Zellen auszuwirken: Nach einer Kultivierung beider Zelllinien zeigt sich nach 48h eine Reduktion des Zellwachstums im Vergleich zur Kontrollgruppe, ein Viabilitätsverlust kann jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Im Zeitintervall von 48h bis 72h verdoppelt sich die Zellzahl in Kultur von Saos-2 und NIH 3T3 Zellen, wobei nach

72h Kultivierung 17% adhärenter Saos-2 und NIH 3T3 Zellen eine letale Schädigung aufweisen, welche innerhalb der Kontrollgruppe nicht nachgewiesen wurde.

Die von uns durchgeführten Versuche zeigen, daß vitale Zellen in einem Untersuchungszeitraum bis zu 72h nach HDB bisher unbekannten, hohen hydrostatischen Drücken standhalten können. Die Druckbereiche, die eine letale Schädigung der untersuchten Zelllinien verursachen, sind zum einen abhängig von der Höhe des applizierten Drucks und weisen zum anderen auch zellspezifische Unterschiede auf.

Durch diese Versuche zeigte sich überdies, daß die HDB als Methode zur Abtötung von Mikroorganismen in vitalem Gewebe eine Möglichkeit darstellt, als therapeutisches Verfahren zur Anwendung zu gelangen. Es ist sinnvoll, als weitere physikalische Größe höhere, bzw. niedrigere Temperaturen während der HDB zu verwenden, da Bakterien bei Temperaturen höher als 35°C und bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt wesentlich sensibler gegen hohe Drücke reagieren. Auch die Anwendung längerer Druckplateaus sowie schnellerer Druckaufbau- und Druckabbauraten sind weitere Möglichkeiten, einen Bereich zu finden, der eine selektive Schädigung von Mikroorganismen zuläßt.

Versuche zu mechanischen Eigenschaften von Knochengewebe nach Hochdruckbehandlung

In weiteren exemplarischen Untersuchungen wurden Knochenzyylinder mit einer diamant-beschichteten Spezialfräse aus paarigen humanen Oberschenkelknochen, d.h. aus Schenkelhals (entlang Längsachse) und distaler Epiphyse (quer) entnommen. Die Größe

der Zylinder betrug 7,5 mm Durchmesser und 15 mm Länge. Die mechanische Prüfung erfolgte in einer Universal-Prüfmaschine mit speziell konstruierten Halterungen in Form eines Druckversuches mit je 20 Proben unbehandelter, mit 150 MPa hochdruck-behandelter sowie mit 225 MPa hochdruck-behandelter Knochenzy-linder jeweils im Seitenvergleich. Die Druckbehandlung wurde unter den obengen. Bedingungen durchgeführt. Traversen-Geschwindigkeit: 0,1 m/s. Es ergab sich überraschenderweise mit 150 MPa Druckbehandlung keine signifikante Reduktion und mit 225 MPa Druckbehandlung nur eine geringe Minderung der Bruchlast von 15 %.

Diese Versuche zeigen, daß Knochen bzw. Knochenteile die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Drücke überstehen, ohne daß eine wesentliche Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften auftritt. Demgemäß können die erfindungsgemäß behandelten Knochen nach dem erfindungsgemäßen Druckbehandlungsverfahren als Transplantate verwendet werden. Bei Anwendung von Drücken über 225 MPa können die mechanischen Eigenschaften von Knochen verändert werden.

Druckbehandlungsverfahren von Zellen

Ansprüche

1. Verfahren zur Veränderung der Replikationsfähigkeit und/oder der Proteinstruktur von menschlichen oder tierischen Zellen und/oder menschlichem oder tierischem Gewebe und/oder von in oder mit den Zellen und/oder dem Gewebe vorliegenden Mikroorganismen oder Prionen, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen und/oder das Gewebe und/oder die in oder mit diesen Zellen vorliegenden Mikroorganismen Drücken von über 100 MPa in einem bei diesen Drücken flüssigen Medium ausgesetzt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in Form von Zellverbänden vorliegen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Zellverbände Gewebe eingesetzt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewebe nur zu einem geringen Teil aus Zellen besteht.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß

als Gewebe Knochen, Knorpel, Sehnen, Bänder, Gefäße, oder andere Gewebe oder Organe eingesetzt werden.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Zellverbände Tumorzellen und/oder Mikroorganismen und/oder Prionen enthalten.
7. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Zellen mit Mikroorganismen, die Bakterien, Viren, Pilze und/oder Protozoen sind, und/oder mit Prionen kontaminiert sind.
8. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
als Gewebe zu transplantierendes Gewebe eingesetzt wird.
9. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
das zu transplantierende Gewebe nach der Druckbehandlung weitgehend ohne Zellen vorliegt.
10. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
Drücke im Bereich von 100 - 1000 MPa, bevorzugt bis 800, 600, 500, 300, 250, 200 oder 150 MPa eingesetzt werden.

11. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
Drücke im Bereich von 100 - 225, bis 175 oder bis 150 MPa
eingesetzt werden.
12. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
zur Hemmung der Replikationsfähigkeit der Zellen und/oder
der Mikroorganismen Drücke ab 200, bevorzugt ab 225 Mpa ein-
gesetzt werden.
13. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet, daß
mehrfache oder variable Druckbehandlungen mit Drücken unter
200 MPa, bevorzugt 150 MPa, eingesetzt werden.
14. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
bei der Druckbehandlung von Knochen Drücke eingesetzt wer-
den, die 50 - 100 MPa über den bei Weichteilgewebe, z.B.
Sehnen, eingesetzten Drücken liegen.
15. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
der Druck so gewählt wird, daß die immunogenen Oberflächen-
bereiche der Zellen des Gewebes verändert werden, die Repli-
kationsfähigkeit der Zellen jedoch weitgehend erhalten
bleibt.

16. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
der Druck so gewählt wird, daß selektiv insbesondere die
Tumorzellen, entzündetes Gewebe und/oder die in oder mit den
druckbehandelten Zellen vorliegenden Mikroorganismen in
ihrer Replikationsfähigkeit inhibiert oder abgetötet werden
und/oder ihre Proteinstruktur verändert wird oder das patho-
gene Potential von Prionen zumindest verringert wird.
17. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Zellen des Knochen-, Sehnen- und/oder Gefäßgewebes von
Transplantaten solchen Drücken ausgesetzt werden, die ihre
Replikationsfähigkeit im wesentlichen inhibieren oder sie
abtöten.
18. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Drücke für einen Zeitraum von einer Sekunde bis zu mehreren
Stunden aufrechterhalten werden.
19. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Druckbehandlung 5 bis 60, bevorzugt 5 bis 30 oder 5 bis
10 Sekunden, weiterhin bis zu 3, bevorzugt bis zu 2 oder bis
zu einer Stunde, weiterhin bis zu 60, bevorzugt bis zu 40
oder 30 oder 10 oder fünf Minuten aufrechterhalten bleibt,
je in Abhängigkeit von den zu behandelnden Zellen oder Zell-
verbänden oder Mikroorganismen.

20. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Druckbehandlung mehrmals, bevorzugt 1 bis 10 mal wiederholt wird.
21. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Druckbehandlung zumindest eine Druckaufbau-, Druckhalte- und Druckabbauphase aufweist, die mehrfach wiederholt werden kann.
22. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die Temperatur während der Druckbehandlung -45 bis +150 °C, bevorzugt +20 bis 40 °C oder +32 bis 40 °C oder +36 bis 38 °C beträgt.
23. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
die zu behandelnden Zellen von zumindest einer flüssigkeitsdichten Hülle umgeben sind und die Flüssigkeit außerhalb der Hülle vorliegt.
24. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, daß
als Flüssigkeit ein Gemisch aus einem viskosen Mittel, bevorzugt Glykol, und Wasser, oder Ether und Kerosin oder ein

bei den eingesetzten Drücken flüssiges Gas oder Gasgemisch eingesetzt wird.

25. Verwendung von durch ein Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche behandelten Zellen in der Transplantationsmedizin, zur Herstellung von Gewebepreparaten und als diagnostisches Mittel.
26. Verwendung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die behandelten Zellen Knochen, Gefäße und/oder Sehnen sind.

Adhäsion U2 OS 72

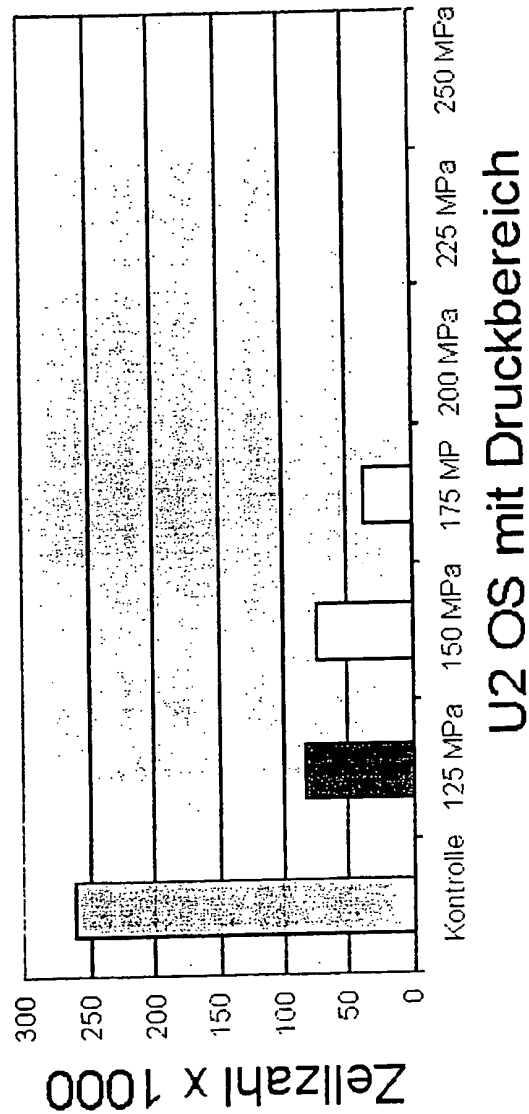
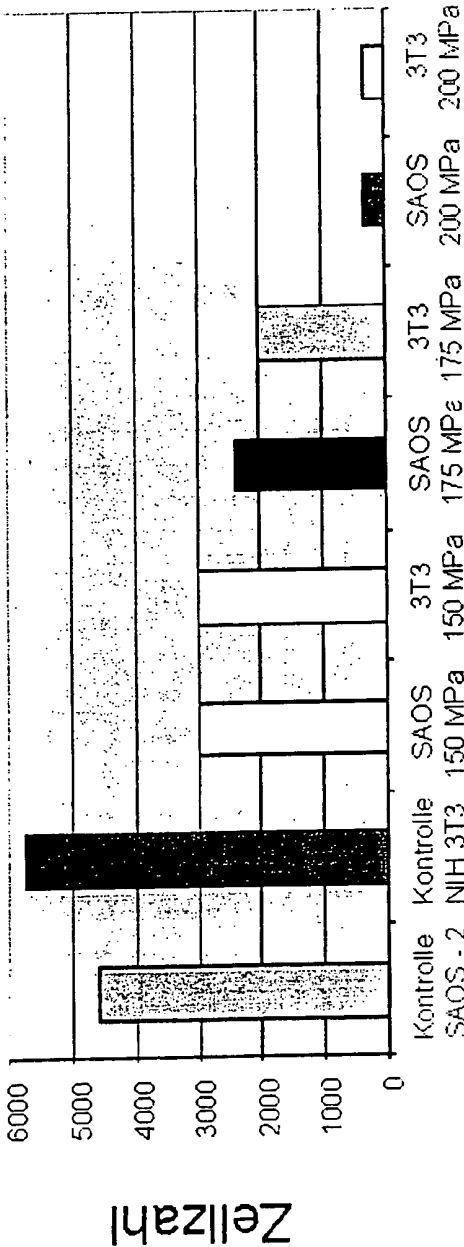


Fig. 1

2/5

Zellviabilität nach 48 h Kultur

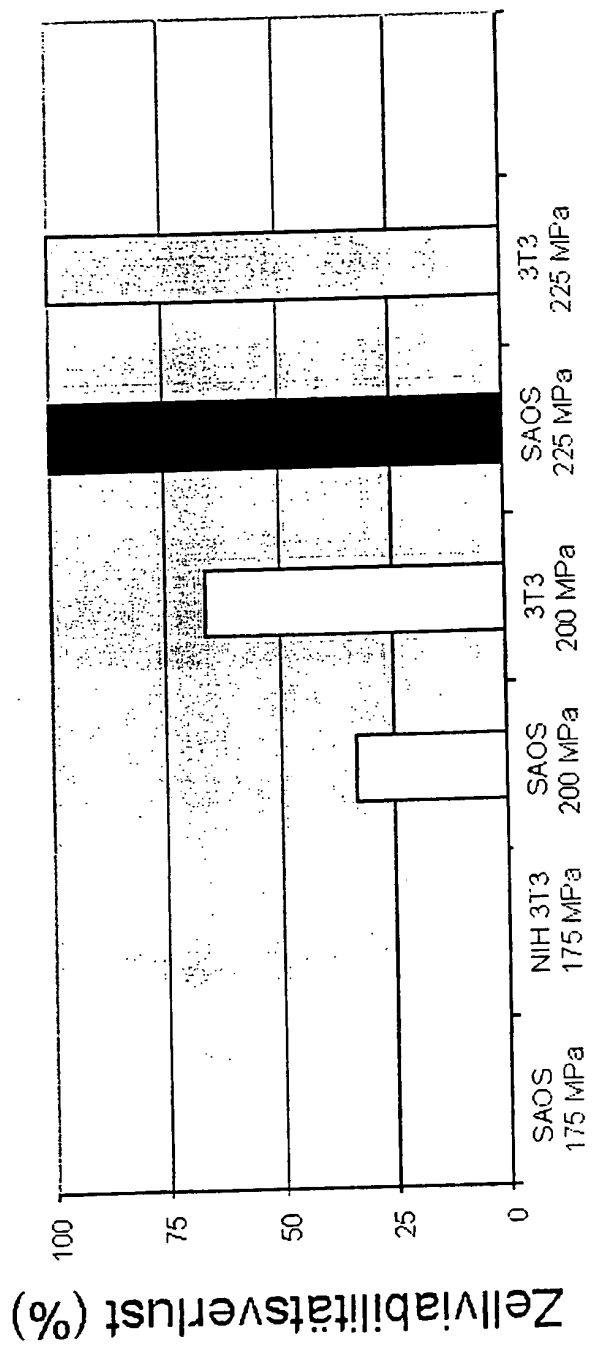


Zelllinien und Druckstufen

Fig. 2

3/5

Zellviabilitätsverlust nach 48 h Kultur

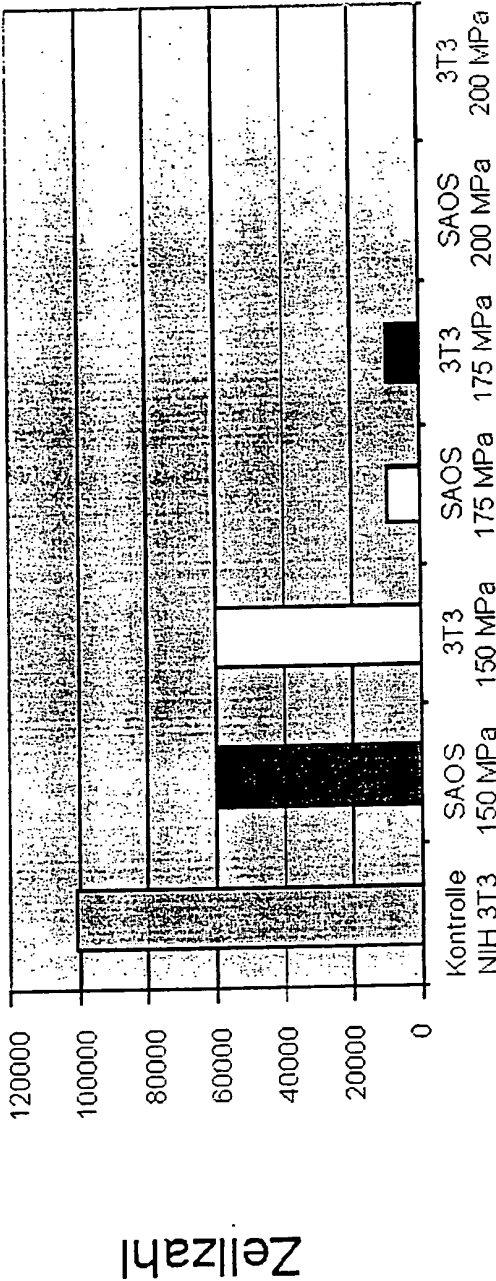


Zelllinie mit Druckbereich

Fig. 3

4/5

Zelladhäsion nach 72 h Kultur

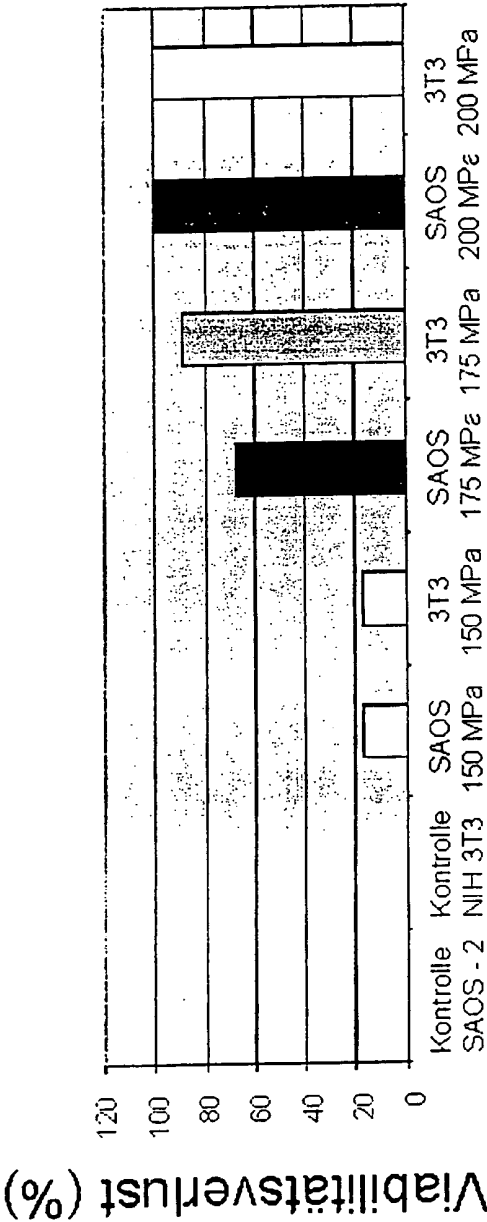


Zelllinien mit Druckbereich

Fig. 4

5/5

Viabilitätsverlust nach 72 h Kultur



Zelllinien im Druckbereich

Fig. 5